

*HENRIQUE JOSÉ VIRGILI SILVEIRA*

*AValiação DAS LESões TECIDUAIS HEPÁTICAS  
DURANTE ISQUEMIA FRIA APÓS PERFUSÃO COM  
ANÁLOGO DE PROSTAGLANDINA E1.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS*

*CAMPINAS*

*2003*

**HENRIQUE JOSÉ VIRGILI SILVEIRA**

***AValiação das Lesões Teciduais Hepáticas  
Durante Isquemia Fria Após Perfusão com  
Análogo de Prostaglandina E1.  
Estudo Experimental em Ratos***

200328652

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Cirurgia, área de Cirurgia.*

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ SÉRGIO LEONARDI**

**CAMPINAS**

**2003**

ii

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

---

## **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

Orientador: Prof. Dr. LUIZ SÉRGIO LEONARDI

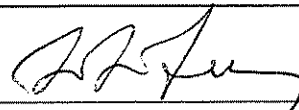
---

---

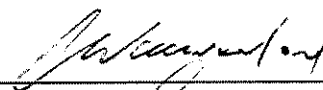
### **Membros:**

---

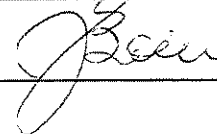
1. Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi



2. Prof. Dr. Maurício Iasi



3. Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin



Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 28/02/2003**

---

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, José Jacob e Estela  
Por todo o amor e compreensão  
que sempre me dedicaram  
Por tudo que me ensinaram e, Pela  
sólida formação ética e moral que  
me proporcionaram.*

*À minha filha, Ana Paula,  
Que tem iluminado meu caminho e,  
Tornado todos os obstáculos mais  
fáceis de serem superados.*

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, que me orientou e incentivou em toda minha formação cirúrgica, com espírito congregador , dedicação, seriedade e eficiência tanto na área de pesquisa quanto de assistência aos doentes.

À Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, que permitiu o acesso ao laboratório de anatomia patológica e demonstrou paciência e dedicação nas análises de biópsias e elaboração dos critérios de classificação.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna, que nos preparou para análise estatística crítica e fundamentada.

À Dra. Luciana Rodrigues de Meirelles , que prestou auxílio fundamental nas análises das biópsias e cujo ânimo e bom humor tornou mais leve o trabalho.

Ao Dr. José Augusto Stédile , que realizou as fotografias da microscopia e auxiliou nas análises das biópsias.

À Gracinda Lourdes Jorge, bióloga, que com total dedicação e eficiência preparou os animais e o instrumental cirúrgico além de auxiliar nas cirurgias.

Ao Dr. José Antônio Pupo da Silveira, pela amizade e companheirismo no exercício da profissão e por seu apoio nas horas de maior dificuldade.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xiii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVO</b> .....	20
<b>3. METODO</b> .....	22
Preparo dos Animais .....	23
Preparo da Solução de Preservação .....	24
Perfusão .....	24
Análise Histológica .....	26
Análise Estatística .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	39
Modelo Experimental .....	40
Análise das Biópsias .....	41
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
<b>8. ANEXOS</b> .....	54

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

AMP	monofosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
DAG	diacilglicerol
H +	íon hidrogênio
H.E.	hematoxilina-eosina
IP3	inositol 1-4-5 trifosfato
kg	quilograma
l	litro
mcg	micrograma
mg	miligrama
ml	mililitro
M.O.	microscopia óptica
NAD +	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
SF	soro fisiológico
° C	grau Celsius
T.M.	tricrômio Massom
UI	unidade internacional
%	porcento

	<b>PÁG</b>
<b>Tabela 1:</b> Lesões teciduais observadas nos animais do grupo controle após 18 horas de isquemia.....	55
<b>Tabela 2:</b> Lesões teciduais observadas nos animais do grupo teste após 18 horas de isquemia.....	56
<b>Tabela 3:</b> Lesões teciduais observadas nos animais do grupo controle após 24 horas de isquemia.....	57
<b>Tabela 4:</b> Lesões teciduais observadas nos animais do grupo teste após 24 horas de isquemia.....	58



	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1:</b> Perfusão.....	25
<b>Figura 2:</b> Hepatectomia.....	26
<b>Figura 3:</b> Infiltrado inflamatório.....	32
<b>Figura 4:</b> Necrose celular.....	32
<b>Figura 5:</b> Lesão endotelial.....	33
<b>Figura 6:</b> Lesão do epitélio biliar.....	33

	<b>PÁG.</b>
<b>Gráfico 1:</b> Resultados - Edema intersticial.....	34
<b>Gráfico 2:</b> Resultados - Degeneração gordurosa.....	34
<b>Gráfico 3:</b> Resultados - Degeneração hidrópica.....	35
<b>Gráfico 4:</b> Resultados - Infiltrado inflamatório.....	35
<b>Gráfico 5:</b> Resultados - Necrose celular.....	36
<b>Gráfico 6:</b> Resultados - Lesão do epitélio biliar.....	37
<b>Gráfico 7:</b> Resultados - Lesão endotelial.....	37



## *RESUMO*

Foi estudado o efeito de análogo de prostaglandina E1 sobre as lesões teciduais hepáticas que ocorrem durante o período de isquemia fria com o objetivo de verificar se sua utilização em solução de perfusão proporciona maior proteção ao parênquima hepático.

Utilizou-se 30 ratos machos, divididos em dois grupos: controle, perfundido com solução de Wisconsin e o segundo grupo perfundido com solução de Wisconsin acrescida de análogo de prostaglandina E1 (misoprostol). Foram colhidas biópsias imediatamente após a perfusão e depois com intervalos de 12, 18 e 24 horas após a perfusão.

As variáveis estudadas em cada biópsia foram edema intersticial, degeneração hidrópica, degeneração gordurosa, lesão endotelial, lesão do epitélio biliar, necrose celular e infiltrado inflamatório. Essas variáveis foram comparadas em cada grupo com o teste de Mann-Whitney, para variáveis não paramétricas.

Nos períodos de 12 e 18 horas não observou-se diferença significativa em nenhuma variável entre os grupos. No período de 24 horas foi observado uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) nas variáveis necrose celular, lesão endotelial e infiltrado inflamatório.

Conclui-se que a utilização de análogo de prostaglandina E1 na perfusão hepática confere proteção ao tecido hepático quando submetido a um período de isquemia mais prolongado.



## *ABSTRACT*

The effect of prostaglandin E1 analogue in hepatic injury during cold ischemia were evaluated in this study. The objective to verify if occur attenuation in the ischemic liver damage.

Thirty male rats were divided in two groups of 15 animals each: control, where was perfused with University of Wisconsin solution and test group, which was perfused with this solution added of prostaglandin E1 analogue (misoprostol). Biopsies were obtained immediately after perfusion and with 12, 18 and 24 hours after the perfusion.

The variables analysed were tissular edema, hidropic changes, fatty changes, endothelium injury, bile duct injury, necrosis and inflammatory process. The Mann-Whitney test for non-parametric variables was used to compare the samples.

In the period of 12 and 18 hours no statistical differences were found in biopsies. In the period of 24 hours necrosis, endothelium injury and inflammatory process were significantly more ( $p < 0,001$ ) in control group.

The author concluded that utilization of prostaglandin E1 analogue in hepatic perfusion has a protective effect of hepatic tissue injury during prolonged storage.



## *1. INTRODUÇÃO*

Na última década, com os avanços na imunossupressão e na preservação de órgãos, o transplante hepático firmou-se como método de escolha para tratamento de doenças hepáticas em fase terminal.

Os métodos de preservação têm como objetivo manter o órgão com um mínimo de lesão tecidual pelo maior período de tempo possível, permitindo com isso o transporte do órgão do local de captação até o centro de transplante, o preparo adequado do receptor e da equipe médica responsável pelo implante do órgão, mantendo-o com boa qualidade funcional no período pós operatório.

Em 1967, BELZER obteve sucesso na preservação de rins por até três dias com perfusão contínua destes com crioprecipitado. COLLINS, em 1969, com uma solução altamente concentrada em potássio, magnésio, glicose e fósforo preservou rins satisfatoriamente por 30 horas, sem necessidade de perfusão contínua. Esse tornou-se o método de escolha para preservação de rins, fígado e pâncreas até o final da década de 1980, quando a solução da Universidade de Wisconsin começou a ser utilizada. Esta solução é constituída por lactobionato de potássio (100mmol/l), rafinose (30mmol/l), fosfato de potássio (25mmol/l), glutathione (3mmol/l), adenosina (5mmol/l), alopurinol (1mmol/l), sulfato de magnésio (5mmol/l), insulina (16mg/l), penicilina (200.000 UI/l), dexametasona (16mg/l) sódio (25mmol/l) e potássio (125mmol/l), permitindo preservação hepática por até 24 horas (TODO e NERY, 1989; D'ALESSANDRO et al., 1994; KALAYOGLU et al., 1988; PLOEG et al., 1992). O potássio mantém o gradiente iônico, a rafinose minimiza o edema celular enquanto glutathione e dexametasona diminuem a ativação leucocitária e liberação de radicais livres (WERF et al., 1998).

Na prática, porém, o período de isquemia fria associado à boa função do órgão e boa evolução pós operatória do receptor tem se mostrado bem menor (KUROKAWA et al., 1999; BROKELMAN et al., 1999). A falência primária do enxerto que ocorre em 5 a 10 % dos transplantes com alta mortalidade e necessidade de retransplante está associada a lesões ocorridas durante o período de isquemia fria (PLOEG et al., 1993).

Durante o período de isquemia, a ausência de oxigênio resulta num acúmulo de NADH e depleção de ATP e NAD<sup>+</sup> por falha no mecanismo de fosforilação oxidativa. Estas duas últimas moléculas são fundamentais para a glicólise. A reação da lactato



dehidrogenase produz lactato e NAD<sup>+</sup> a partir de piruvato e NADH e íons H<sup>+</sup> . Com isso ocorre esgotamento energético e quebra da homeostase celular e liberação de radicais livres.(PEGG, 1986 ; KERRIGAN e STOTLAND, 1993).

Os hepatócitos parecem suportar melhor a depleção das reservas de energia, uma vez que apresentam estoque de glicogênio que pela via da glicogenólise ainda pode fornecer ATP para a célula (MIES et al., 1991) . Porém células endoteliais e biliares são mais sensíveis à anóxia podendo quando lesadas acarretar complicações como trombose na microcirculação , necrose tecidual e colestase (PALOMBO et al., 1991).

Já foi demonstrado que durante a isquemia fria ocorre edema das células com lesão destas e que a própria temperatura acarreta alterações no estado da membrana lipídica celular ( SOULTHARD e BELZER, 1993; SCHILLING et al., 1998; MARUBAYASHI et al., 1980) .

Os principais problemas relacionados à preservação do órgão são a falência primária do enxerto em até 10% dos casos (KUROKAWA e TAKAGI, 1999) e a diminuição do fluxo de bile após reperfusão do enxerto, com até 30 % de complicações relacionadas às vias biliares (DOUSSET et al.,1994 ; RENTSCH et al., 1996).

Estas complicações estão relacionadas, dentre outros fatores à trombose e falência da microcirculação intra-hepática e lesões do epitélio biliar com diminuição da excreção biliar e lentificação do fluxo biliar intra-hepático (KOEPEL et al., 1998) .

O aprimoramento das soluções de preservação tem sido tentado continuamente, visando uma melhor preservação da estrutura e função dos órgãos. A utilização de análogos de prostaglandinas E2 e I2, misoprostol e óxido nítrico (TOTSUKA et al., 1999; NILSSON et al., 2001; CURTIS et al., 1993; SUYLICHEM et al., 1997) , bloqueadores de canais do cálcio (BROIN et al., 1997; CARTAYA et al., 1991) , antagonistas de cálcio (KIM e SOULTHARD, 1997) , inibição da síntese de glutathione (ATMACA e FRY, 1998) , frutose 1-6 difosfato (FAVERO, 2000) têm mostrado, em estudos experimentais, uma diminuição das lesões teciduais durante o período de isquemia e minimizado as lesões após a reperfusão do órgão.

As prostaglandinas A1, A2, B1, E1, E2, I2 e F 2 alfa são potentes vasodilatadores (ROBINSON et al., 1973). As prostaglandinas E1, E2, e I2 ainda agem como antiagregantes plaquetários e reduzem agregação e ativação leucocitária, bem como liberação de histamina (PETERS et al., 1984). Verificou-se que as prostaglandinas E2 e I2 conferem proteção aos sinusóides hepáticos durante a isquemia fria devido à redução da liberação de proteases e radicais livres de oxigênio pelos leucócitos. Isso ocorre devido à diminuição da atividade e agregação leucocitária (KLEIN et al., 1999; ARAI et al., 1999).

Os efeitos protetores das prostaglandinas sobre o tecido hepático foi relatado inicialmente por STACHURA et al. em 1981. Desde então, outros estudos têm sido realizados demonstrando redução nas lesões teciduais durante o período de isquemia, induzidas pela baixa temperatura, pela anóxia (CRAFA et al., 1991; HELLING et al., 1995; LAMBOTTE et al., 1988; SIKUJARA e MONDEN, 1983; STEININGER et al., 1988; OLTHOFF e WASEF, 1991; BESSE et al., 1989; OKABE et al., 1986). As prostaglandinas E1 e I1 também demonstraram efeito protetor sobre lesões hepatocíticas induzidas por organoclorados e por radicais superóxidos (NAKANO e MONDEM, 1994; MIZOGUCHI et al., 1987).

O mecanismo de ação que confere às prostaglandinas seu efeito protetor é a ativação da adenil ciclase que acarreta um aumento de monofosfato de adenosina (AMP cíclico) intracelular (SWEAT e WINCEK, 1973; WISE e JONES, 1994). Nos hepatócitos, o AMP cíclico leva a um efluxo de cálcio que diminui a lesão celular durante o período de isquemia (LEVINE, 1970). O acúmulo de cálcio intracelular ativa a enzima ATP-ase cálcio dependente, provocando a depleção das reservas teciduais de ATP; ativando também enzimas proteolíticas que causam lesão da membrana celular através de peroxidação lipídica (NICOTERA et al., 1986). A diminuição do cálcio intracelular leva a vasodilatação e, o aumento de AMP cíclico inibe o processo de agregação plaquetária (YUN et al., 1991; GEIGER et al., 1994).

A agregação e ativação leucocitária provocam lesão celular através da liberação de radicais superóxidos pela NADPH oxidase. Com o aumento de AMP cíclico ocorre redução do cálcio intracelular nos neutrófilos e ativação da proteína C quinase; com

supressão da agregação neutrofílica , liberação de enzimas lisossomais e ativação da NADPH oxidase (MITSUYAMA et al., 1993) .

O epitélio biliar apresenta lesões estruturais em período de isquemia fria mais curto que o hepatócito, acarretando as complicações já referidas. Sua lesão decorre dentre outros fatores da lesão dos sinusóides pericanaliculares e da ação de radicais livres (YASUI et al., 1998).

O misoprostol é um análogo da prostaglandina E1, disponível sob a forma de drágeas com 200mcg da droga em cada unidade. Já foi demonstrado que administração de prostaglandinas, dentre as quais a prostaglandina E1 ou seu análogo, o misoprostol, reduz a lesão tecidual hepática durante períodos de isquemia quente e após a reperfusão do órgão (ARAI et al.,1999; CRAFA et al.,1991; TOTSUKA et al.,1999; CURTIS et al., 1993). Em estudos utilizando prostaglandina E1 ou seus análogos em solução de perfusão de fígado e rins, obteve-se melhor preservação dos órgãos com doses variando entre 10 mcg/kg a 100 mcg/kg , observando-se que a um aumento da concentração da droga não correspondia incremento semelhante na preservação do órgão (HELLING et al., 1995; MIZOGUCHI et al., 1987).

Sabe-se que alterações celulares durante períodos de isquemia são proporcionais à intensidade da agressão e são o resultado final das alterações bioquímicas e moleculares pelas quais o tecido é acometido, sendo passíveis de avaliação e mensuração por microscopia óptica ou eletrônica (IASI et al.,1996; CHAPCHAP, 1992).

O misoprostol é um análogo de prostaglandina E1 de custo acessível e fácil manipulação que pode vir a ser utilizada na prática clínica para perfusão de órgãos com o objetivo de minimizar as lesões teciduais durante o período de isquemia fria.



## ***2. OBJETIVO***

O trabalho proposto analisa as alterações ocorridas, durante isquemia fria , no parênquima hepático de ratos submetidos a hepatectomia total, após perfusão com solução da Universidade de Wisconsin e perfusão com essa solução acrescida de análogo de prostaglandina E1 (misoprostol).

Objetiva-se com isso identificar as lesões teciduais mais freqüentes em cada grupo e verificar se a perfusão com análogo de prostaglandina E1 proporciona sua atenuação.



### ***3. MÉTODO***

## Preparo dos animais

Foram estudados dois grupos de *Rattus norvegicus*, variedade albina, da linhagem Wistar, machos, compostos cada grupo por quinze animais, procedentes do biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. A idade dos animais é de oito semanas de vida, com seu peso variando de 290 a 315 gramas, com média de 302 gramas.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura controlada, alimentados com ração padronizada e água *ad libitum*.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob protocolo 200-1.

Todos os animais foram anestesiados por via endovenosa, através de punção na veia caudal, com pentobarbital (tiopental sódico) a 2,5% na dose de 20 mg para cada 1 kg de peso e mantidos em ventilação sob máscara com oxigênio a 100 % (CARUY, 1998). A efetividade da anestesia foi verificada observando-se ausência do movimento de retirada após preensão plantar com pinça.

A seguir, os animais foram submetidos a tricotomia da região abdominal com tonsurador elétrico e colocados em decúbito dorsal horizontal, fixados à prancha operatória por meio de fita adesiva. A antissepsia foi realizada com solução de álcool iodado a 2% e o campo operatório foi delimitado por um campo fenestrado.

O acesso à cavidade abdominal foi obtido através de uma incisão subcostal bilateral, sendo a parede abdominal rebatida inferiormente, proporcionando campo cirúrgico amplo na região hepática. Todos os animais foram operados pelo mesmo cirurgião.

## **Preparo da solução de preservação**

Foram utilizadas solução de perfusão da Universidade de Wisconsin, marca Viaspan<sup>R</sup> no grupo controle.

O análogo de prostaglandina E1 utilizado foi o misoprostol, Cytotec<sup>R</sup> – laboratório SEARLE, obtido após aprovação do projeto de pesquisa pela vigilância sanitária e pelo Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo. As drágeas de misoprostol, contendo 200 mcg da droga cada, foram obtidas na farmácia do Centro de Atendimento Intergral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP.

Cada drágea de misoprostol foi diluída em 100 ml de SF 0,9%, formando uma solução contendo 2,0 mcg de misoprostol por ml.

A cada 46 ml da solução de perfusão de Wisconsin foram acrescentados 4,0 ml da solução de misoprostol, de forma a conter 8 mcg de misoprostol (25 mcg/ kg de peso).

## **Perfusão**

Após o preparo do campo cirúrgico, foi realizada dissecação romba da aorta e da veia porta com hastes flexíveis com ponta de algodão. A aorta foi isolada com fios de sutura ( algodão 4.0) acima da emergência das artérias ilíacas comuns e acima da emergência do tronco celíaco. A veia porta foi isolada, igualmente, próximo à sua origem. Com as estruturas devidamente isoladas foram administradas 300 UI de heparina pela veia caudal do animal.

A seguir, a aorta e a veia porta foram cateterizadas, com cateter de silicone, sendo realizado a ligadura da aorta acima do tronco celíaco ( figura 1). Foram infundidos 30ml de solução de perfusão na aorta e 20 ml na veia porta, a 4° C, a uma velocidade de 5 ml por minuto, com pressão de 30 cm de água. No início da perfusão realizou-se a secção da veia cava inferior supra-hepática, a fim de promover a drenagem hepática. O fígado foi envolvido com SF 0,9% congelado, moído durante o período de perfusão.

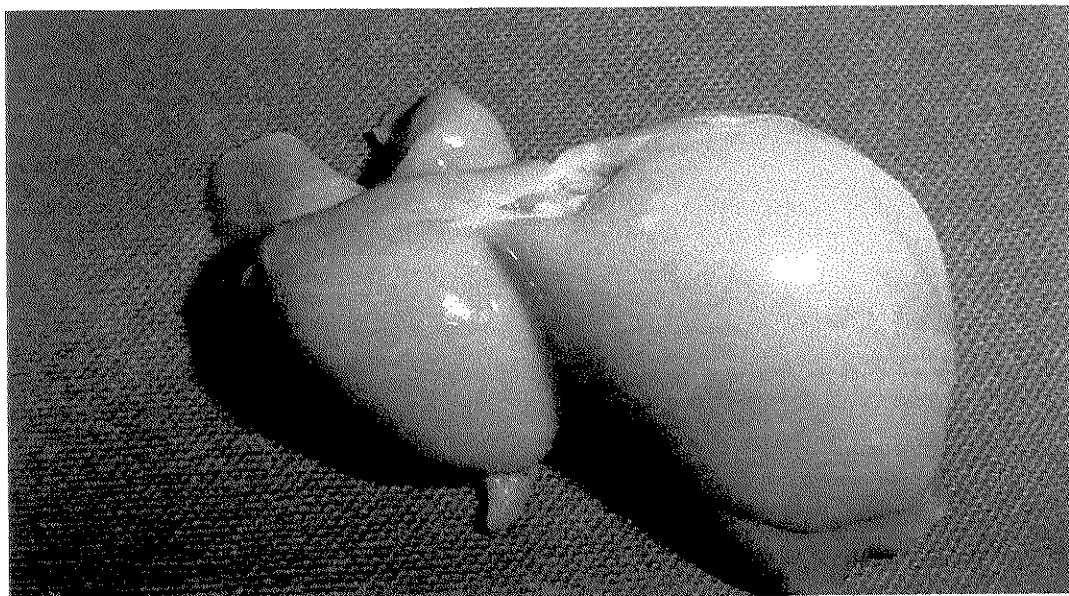




**Figura 1 - Observa-se a aorta (à esquerda) e a veia porta (à direita) cateterizadas, antes do início da perfusão.**

Imediatamente após o término da perfusão, foram colhidas biópsias hepáticas que foram fixadas em formalina a 10% por 24 horas. O órgão foi acondicionado em recipiente plástico, banhado por solução de perfusão e armazenado a uma temperatura de 4 ° C. Novas biópsias foram realizadas com 12, 18 e 24 horas após a perfusão e fixadas em formalina 10%.

O primeiro grupo, denominado grupo controle, teve o fígado perfundido com solução da Universidade de Wisconsin, enquanto o segundo grupo, denominado grupo teste, foi perfundido com a mesma solução acrescida de prostaglandina E1 25 mcg/kg.



**Figura 2** - Hepatectomia total. Observa-se o fígado imediatamente após perfusão.

### **Análise histológica**

As amostras obtidas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina e pelo tricrômio Masson. A análise das biópsias foi feita por um patologista e pelo autor do trabalho.

Após o preparo histológico as lâminas foram numeradas continuamente de 1 a 240, não permitindo a identificação do grupo de animais ou do período de isquemia pelo patologista ou pelo autor durante sua análise. Após essa análise a numeração foi removida, permitindo a identificação do animal, grupo a que pertencia e tempo de isquemia.

Foi utilizado microscópio óptico , em aumentos de 20 a 200 vezes. e as lesões teciduais foram classificadas segundo os seguintes parâmetros:

A - Edema intersticial:

- 0 - sem edema
- 1 - espaço intercelular levemente aumentado
- 2- aumento do espaço intercelular em 1/3 do diâmetro das células parenquimatosas
- 3 - aumento do espaço intercelular maior que 1/3 do diâmetro das células parenquimatosas

B – Degeneração hidrópica das células

- 0 - sem degeneração hidrópica
- 1 - gotículas pequenas e esparsas
- 2 - gotículas que abrangem mais que 50% do citoplasma
- 3 - citoplasma repleto de gotículas ou atenuação textural

C – Degeneração gordurosa

- 0 - sem degeneração gordurosa
- 1 - gotículas pequenas e esparsas
- 2 - gotículas que abrangem mais que 50% do citoplasma
- 3 - citoplasma repleto de gotículas gordurosas

D – Lesão do epitélio biliar

- 0 – ausência de lesão
- 1 - pequena descamação em menos de 50% dos ductos
- 2 - descamação de 50% ou mais dos ductos
- 3 - ausência de revestimento celular dos ductos

#### E – Infiltrado inflamatório

- 0 - células inflamatórias ausentes em espaço portal e sinusoidal
- 1 - células inflamatórias esparsas em espaço portal e sinusoidal
- 2 - células inflamatórias infiltrando espaço portal, sinusoidal e intersticial
- 3 - intenso infiltrado de células inflamatórias

#### F – Lesão endotelial

- 0 – ausência de lesão, endotélio íntegro
- 1 - destacamento leve de células endoteliais
- 2 - perda do revestimento endotelial em até 50% dos vasos
- 3 - perda do revestimento endotelial em mais de 50% dos vasos.

#### G – Necrose

- 0 – ausência de necrose celular
- 1 - até 25% de necrose
- 2 - 25 a 50% de necrose
- 3 - acima de 50% de necrose

As alterações teciduais foram classificadas de 0 a 3 correspondendo o zero à ausência de alterações, 1 a alterações leves, 2 a moderadas e 3 a alterações graves.

## **Análise Estatística**

Foram comparadas cada variável do grupo controle e do grupo teste, entre si, nos períodos de 12, 18 e 24 horas.

Nos casos onde foi verificado apenas alterações leves nos dois grupos, foi aplicado o teste exato de Fisher.

Onde houve lesões com diferentes graduações em um ou nos dois grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas.

A hipótese de igualdade das variáveis de cada grupo foi rejeitada para valores de  $p < 0,05$ .



## ***4. RESULTADOS***

Todos os animais foram submetidos a biópsia no momento imediato após ao término da perfusão. Novas amostras foram coletadas 12 horas, 18 horas e 24 horas após a perfusão.

Todas as biópsias realizadas imediatamente após a perfusão não apresentaram edema intersticial, degeneração hidrópica ou gordurosa, lesões em endotélio e epitélio biliar, infiltrado inflamatório ou necrose do parênquima; funcionando portanto como controle de uma perfusão adequada e ausência de alterações pré existentes nas amostras estudadas.

As amostras colhidas após 12 horas de isquemia demonstraram edema intersticial leve em três casos em cada grupo. Não foram observados degeneração hidrópica ou gordurosa, lesão de endotélio ou epitélio biliar, infiltrado inflamatório ou necrose tecidual em nenhuma amostra nesse período.

Após 18 horas de isquemia, observamos três casos de edema intersticial leve no grupo controle e quatro casos de edema intersticial leve no grupo perfundido com solução acrescida de análogo de prostaglandina E1. Degeneração gordurosa foi observado em sua forma leve em dois casos em cada grupo. O grupo controle apresentou apenas um caso de degeneração hidrópica enquanto o grupo teste apresentou dois casos. Infiltrado inflamatório leve foi observado em três casos no grupo controle e dois casos no grupo teste. Os dois grupos apresentaram três casos de necrose celular em sua forma leve. O epitélio biliar apresentou lesão leve em três casos no grupo controle e dois casos no grupo teste. Observou-se três casos de lesão moderada de endotélio e outro de lesão leve no grupo controle , enquanto o grupo teste apresentou apenas um caso de lesão endotelial leve.

No período de isquemia fria de 18 horas todas as variáveis apresentaram valor de  $p > 0,05$  ; sendo lesão endotelial a variável onde observou-se o menor valor de  $p$  ( $p=0,12$ ).

Esses dados são mostrados nas tabelas 1 e 2.

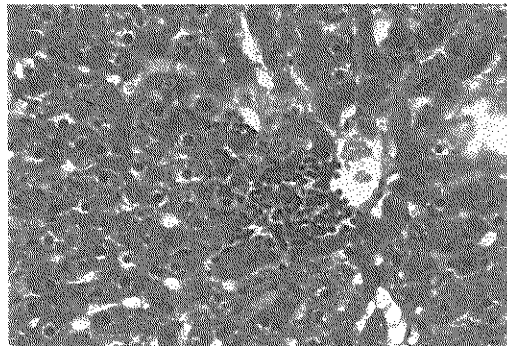
Com 24 horas de isquemia fria, foram observados cinco casos de edema intersticial leve no grupo controle e quatro no grupo teste. Degeneração gordurosa foi observada em sua forma moderada em dois casos e na forma leve em um caso no grupo controle e apenas dois casos na forma leve no grupo teste.

Os dois grupos apresentaram dois casos de degeneração hidrópica leve. Infiltrado inflamatório leve foi encontrado em dez casos, moderado em três casos e grave em um caso no grupo controle. No grupo teste foi observado infiltrado inflamatório em sua forma leve em três casos.

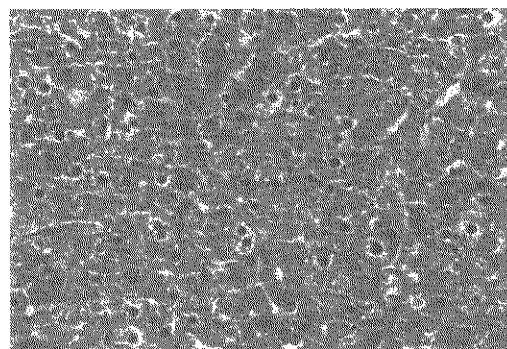
Observou-se dez casos de necrose celular leve, dois moderados e um grave no grupo controle; enquanto no grupo teste foram observados três casos, na forma leve.

O epitélio biliar apresentou lesão leve em cinco casos e moderada em um caso no grupo controle, enquanto o grupo teste apresentou dois casos de lesão leve.

Lesão endotelial leve foi encontrada em seis casos, moderada em três e grave em dois casos do grupo controle. O grupo teste apresentou dois casos de lesão endotelial leve. Esses dados são mostrados nas tabelas 3 e 4.

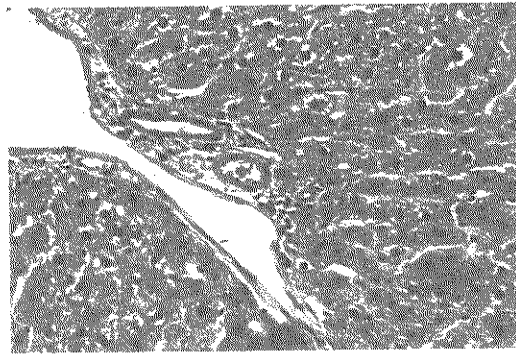


**Figura 3** - Infiltrado inflamatório grave em espaço portal, com perda da arquitetura deste. Observa-se também necrose hepatocítica acentuada. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100x .

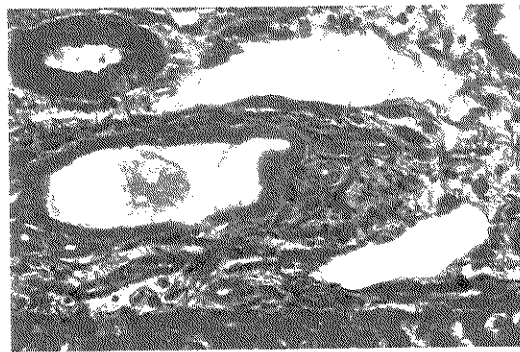


**Figura 3** - Necrose hepatocelular grave, observa-se hepatócitos com perda de núcleo, desarranjo da arquitetura hepatocítica e lise celular. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100x .





**Figura 4** - Espaço porta onde observa-se lesão endotelial moderada, caracterizada pela descontinuidade do endotélio e destacamento de células endoteliais, tanto no ramo arterial quanto no venoso. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100x .



**Figura 5** - Lesão moderada do epitélio biliar. Observa-se áreas onde há descolamento e perda da continuidade do epitélio biliar. Coloração tricrômio Massom. Aumento de 100x.

Os gráficos a seguir exibem para cada tipo de variável estudada o número de alterações observadas em cada grupo e período de isquemia fria.

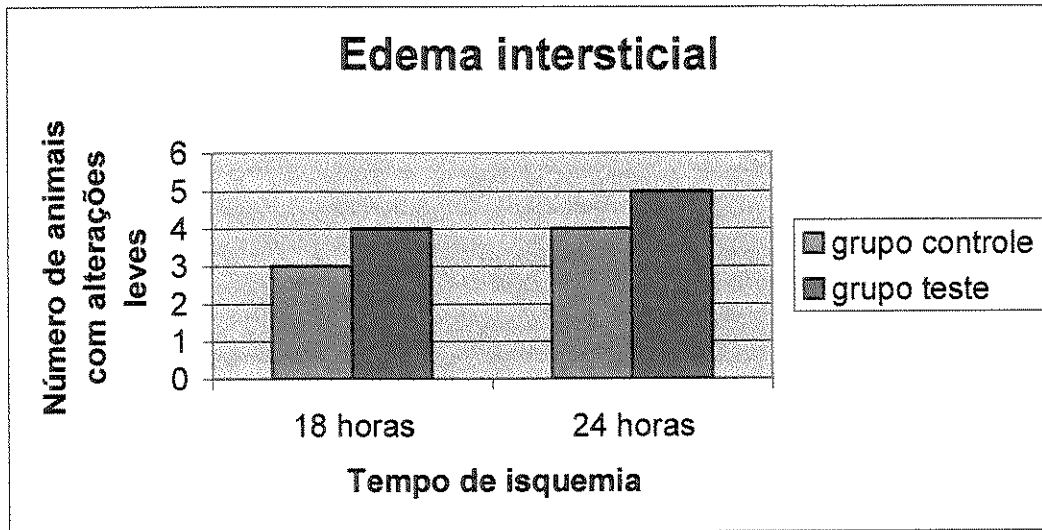


Gráfico 1 – Edema intersticial – comparação entre grupo controle e grupo teste.

$p = 1,0$

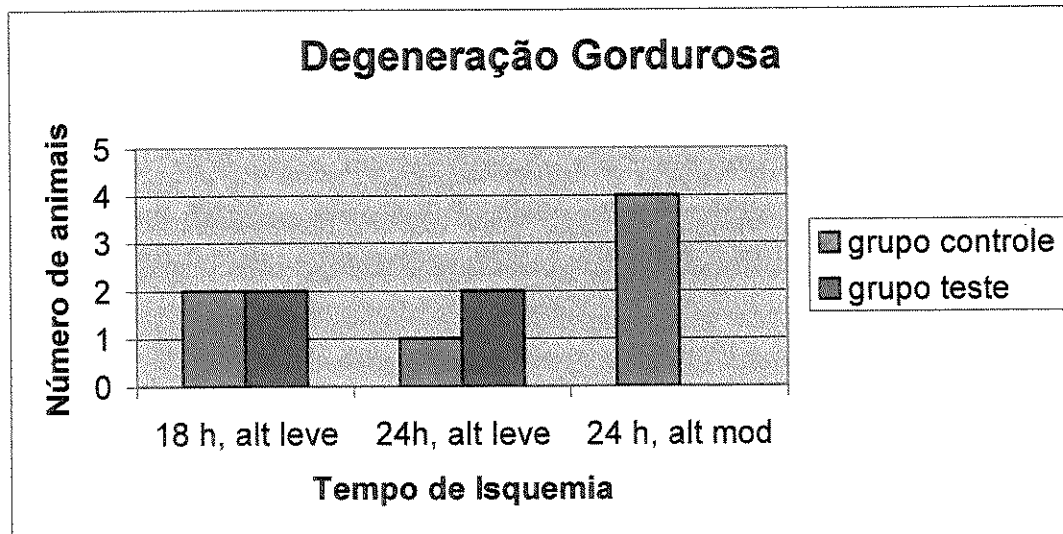


Gráfico 2 – Degeneração gordurosa – comparação entre grupo controle e grupo teste.

$p = 0,54$

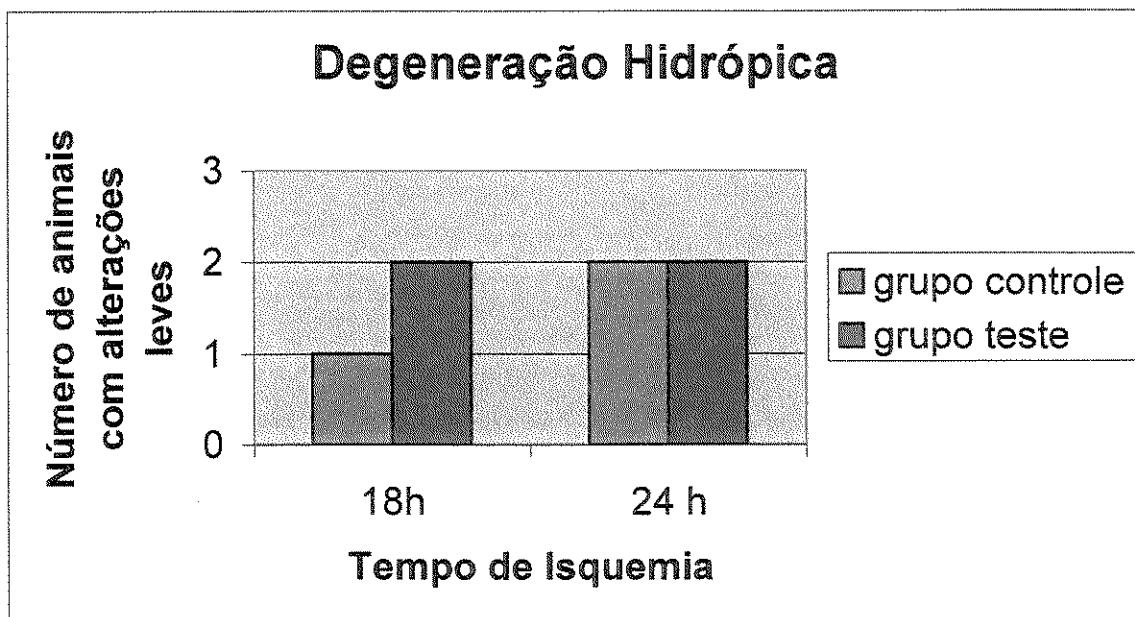


Gráfico 3 – Degeneração hidrópica – comparação entre grupo controle e grupo teste.  
 $p = 1,0$

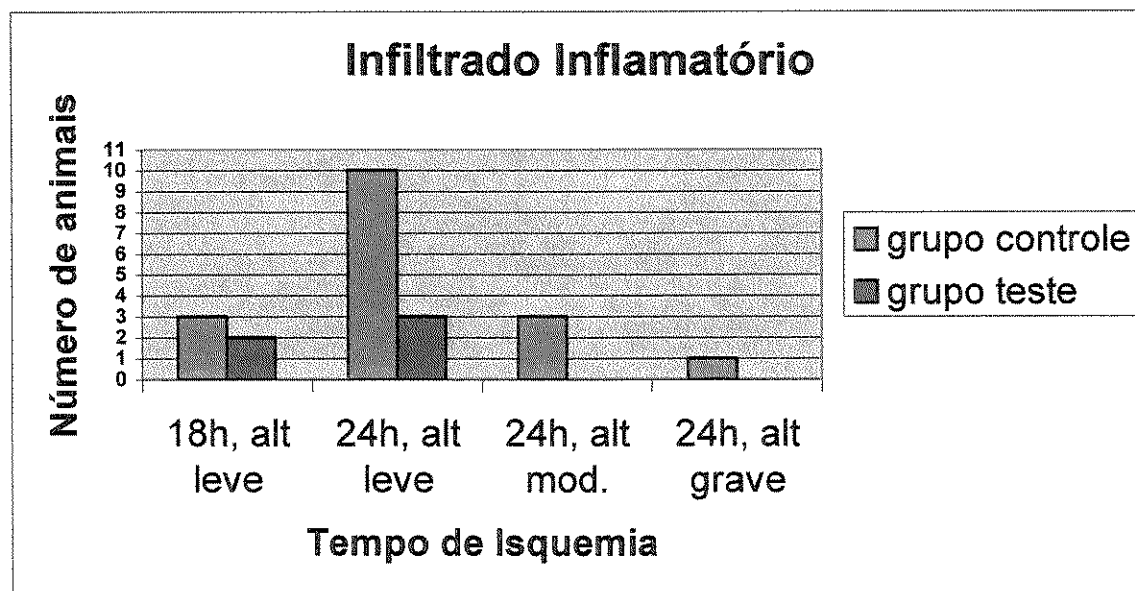
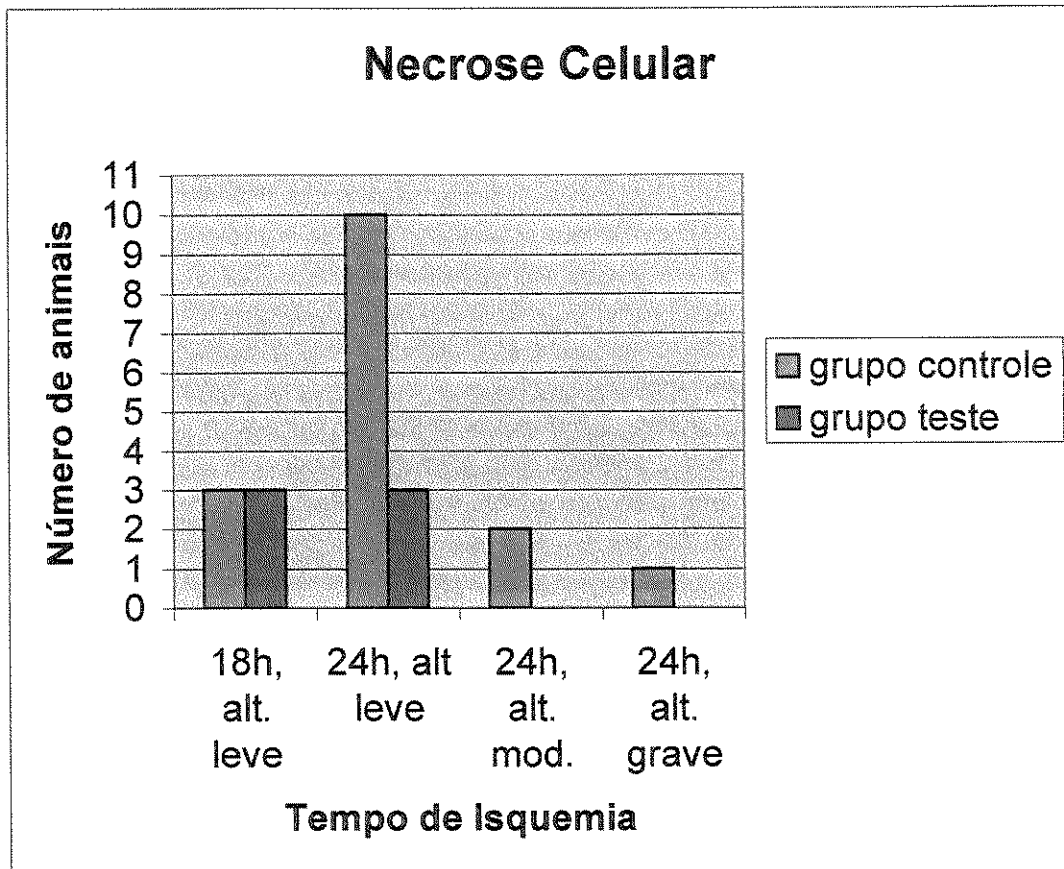


Gráfico 4 – Infiltrado inflamatório – comparação entre grupo controle e grupo teste.  
 $p < 0,001$  no período de 24 horas.



**Gráfico 5** – Necrose celular – comparação entre grupo controle e grupo teste.  
 $p < 0,001$  no período de 24 horas.

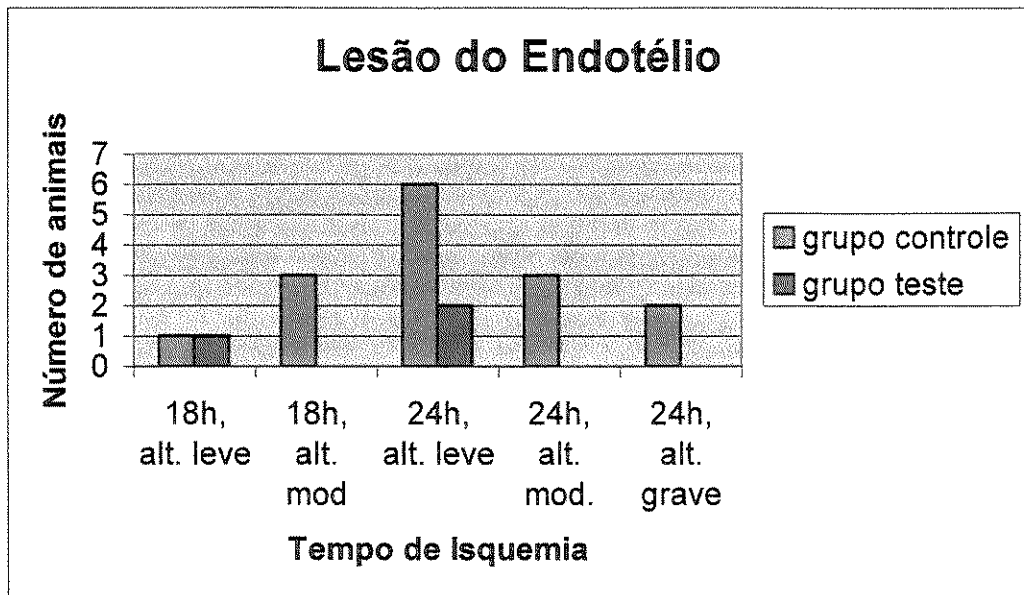


Gráfico 6 – Lesão do epitélio biliar – comparação entre grupo controle e grupo teste.  
 $p = 0,095$  no período de 24 horas.

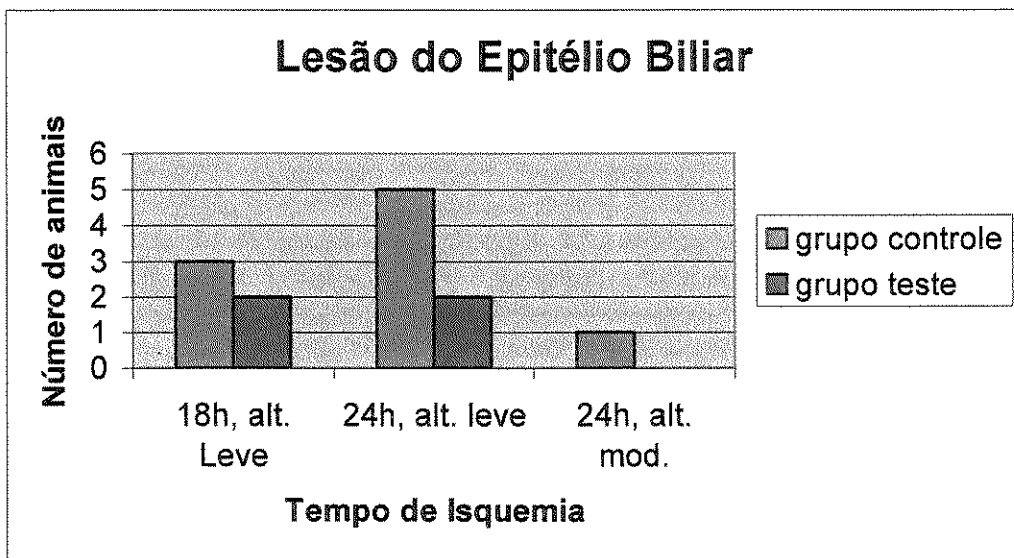


Gráfico 7 – Lesão do endotélio – comparação entre grupo controle e grupo teste.  
 $p=0,12$  no período de 18 horas e  $p<0,001$  no período de 24 horas.

Os resultados obtidos foram analisados comparando os dois grupos entre si no período de 18 horas e de 24 horas.

No período de 18 horas de isquemia, foi aplicado o teste exato de Fisher nas variáveis onde houve apenas alterações leves ou ausência de alterações nos dois grupos e teste de Mann-Whitney para as variáveis onde houve lesão em variados graus. A hipótese de igualdade foi rejeitada para valores de  $p$  inferiores a 0,05. Não foi verificada diferença significativa para edema intersticial, degeneração hidrópica ou gordurosa, infiltrado inflamatório, lesão do epitélio biliar e necrose celular, onde o valor de  $p$  foi igual a 1,0. Para lesão endotelial, foi encontrado  $p = 0,12$ .

Para análise dos resultados após 24 horas de isquemia utilizamos o teste de Mann-Whitney devido à existência de variáveis com mais de um grau, mantendo a rejeição da hipótese de igualdade para valores de  $p$  inferiores a 0,05.

Edema intersticial ( $p = 1,0$ ), degeneração gordurosa ( $p = 0,54$ ) e degeneração hidrópica ( $p = 1,0$ ) não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Infiltrado inflamatório leve foi observado em dez casos no grupo controle e apenas três casos no grupo teste. Foram observados outros três casos de alterações moderadas e um caso de alteração grave no grupo controle, enquanto no grupo teste não foram encontradas lesões moderadas e graves. Encontrou-se significância estatística com  $p < 0,001$ .

Necrose celular leve foi encontrada em apenas três casos no grupo teste, enquanto o grupo controle apresentou dez casos. Alterações moderadas e graves foram encontradas apenas no grupo controle, respectivamente, dois e um caso. Foi observado  $p < 0,001$ .

Lesão endotelial também apresentou  $p < 0,001$ , com seis casos de alteração leve, três de alterações moderadas e dois de lesão grave no grupo controle; enquanto no grupo teste ocorreram apenas dois casos de alterações leves.

Lesão do epitélio biliar apresentou  $p = 0,095$  demonstrando uma tendência a significância estatística. Observou-se dois casos de alterações leves no grupo teste e no grupo controle cinco casos de lesões leves e um de lesão moderada.



## ***5. DISCUSSÃO***

## **Modelo experimental**

Os modelos experimentais utilizados para estudos de isquemia e reperfusão hepática estão limitados a ratos, cães e porcos (FAVERO, 1996; IASI, 1999; MIES et al, 1991) . A escolha do modelo deveu-se à facilidade de obtenção de ratos , seu custo menor em relação aos outros animais, maior facilidade de manipulação e à formação de grupos homogêneos com relação a peso, idade e condições de saúde e nutrição.

O tipo de anestesia foi escolhido devido ao baixo índice de alteração no tecido hepático provocado pelas drogas anestésicas utilizadas (CARUY, 1998).

O análogo de prostaglandina E1 utilizado foi o misoprostol, disponível comercialmente sob forma de drágeas, contendo 200 mcg da droga em cada unidade. O Cytotec<sup>R</sup> é uma droga de baixo custo, sendo possível sua utilização na prática clínica, sem aumento significativo do custo do procedimento. Porém, devidos aos efeitos abortivos da droga, só é liberada sua obtenção após comprovação de sua utilização para fins terapêuticos ou para pesquisa.

O volume da solução de perfusão foi definido após estudo com grupo piloto, onde observou-se que a perfusão arterial com 30 ml e portal com 20 ml eram suficientes para obtenção de um fígado sem áreas não perfundidas ( mosaico) e com um padrão adequado de perfusão. A velocidade e pressão da perfusão foram definidas no mesmo grupo piloto, onde observou-se que uma perfusão mais rápida ou com uma pressão maior, acarretavam lesão celular e endotelial, observados nas biópsias realizadas imediatamente após o término da perfusão.

Os demais parâmetros como temperatura, heparinização e técnica cirúrgica foram mantidos como na técnica padrão utilizada em doadores de órgãos para transplante (PEGG, 1986; D’ALESSANDRO et al, 1994).



## **Análise das biópsias**

Foram utilizadas as colorações com hematoxilina e eosina e com tricrômio Massom uma vez que essas técnicas possibilitam uma avaliação adequada dos hepatócitos, espaços portais e do interstício. A microscopia óptica permite avaliação estrutural e é adequada para revelar o aspecto e a intensidade das lesões (CHAPCHAP, 1992; IASI et al., 1996). As variáveis escolhidas para análise, abrangem as principais alterações possíveis no tecido hepático.

Os graus de alteração são resultados nominais, não contínuos, necessitando um teste estatístico não paramétrico para depuração de sua significância (CHAPCHAP, 1992; FAVERO, 1996).

O período de isquemia de 12 horas não apresentou alterações estruturais quando comparadas às biópsias realizadas imediatamente após a perfusão. As alterações estruturais sucedem alterações bioquímicas (IASI, 1999) e possivelmente não foram encontradas pois não houve tempo suficiente para que ocorressem, devido à diminuição dos processos metabólicos pela baixa temperatura.

Após 18 horas de isquemia, foram observadas alterações leves de edema intersticial, degeneração gordurosa e hidrópica, infiltrado inflamatório, necrose celular e lesão do epitélio biliar. Lesão endotelial foi encontrada em sua forma moderada em três casos no grupo controle e apenas um caso, na forma leve no grupo teste. Mesmo não havendo significância estatística, indica uma tendência a uma menor lesão no grupo teste, demonstrando um fator protetor do análogo de prostaglandina E1 sobre o endotélio.

Após 24 horas da perfusão, verificou-se diferença significativa entre as variáveis infiltrado inflamatório, necrose celular e lesão endotelial. Lesão do epitélio biliar apresentou valor de  $p = 0,095$ . Embora não seja estatisticamente significativa, demonstra uma tendência a uma menor lesão do epitélio biliar no segundo grupo.

O tecido perfundido com misoprostol apresenta menor distúrbio na microcirculação, com vasodilatação e melhor perfusão.

A isquemia hepática provoca degradação de adenina nucleotídeos, levando a catabólitos como o malonildialdeído, xantinas e hipoxantinas (HARVEY e McKEOWN, 1988; MARUBAYASHI et al., 1980). Isso indica que ocorre peroxidação lipídica pela xantina-oxidase provocando lesão celular (McCORD, 1985). A depleção das reservas celulares de ATP resultam em um acúmulo intracelular de cálcio, que ativa a ATP-ase-cálcio-dependente, reduzindo ainda mais as reservas de ATP (FRIEDMAN et al., 1982). Através da ativação da adenil ciclase pela prostaglandina há uma elevação dos níveis de AMP cíclico intracelular, que provoca um efluxo de cálcio (SWET e WINCEK, 1973). Dessa forma a prostaglandina acarreta uma estabilização da membrana celular dos hepatócitos, preservação dos níveis de adenina nucleotídeos e não ativação da xantina-oxidase, minimizando a lesão hepatocítica.

A diminuição dos níveis de cálcio intracelular acarretam vasodilatação devido ao relaxamento do músculo liso dos vasos (MINAMI et al., 1993).

Nas plaquetas, o aumento do AMP cíclico reduz o metabolismo do inositol fosfolipídio, que geraria inositol-1-4-5-trifosfato (IP3) e 1-2-diacilglicerol (DAG) . Desse modo, o aumento de cálcio intracelular promovido pelo IP3 e a ativação da proteína quinase C pelo DAG não ocorrem, inibindo o processo de agregação plaquetária (YUN et al, 1991; GEIGER et al.,1994).

Durante a fase de isquemia, as células de Kupffer liberam mediadores como fator de necrose tumoral e interleucina 1 (COLLETTI, 1990 ). Neutrófilos são ativados por esses mediadores e infiltram o tecido hepatocítico e liberam radica óxidos através da NADPH-oxidase. Esses provocam agregação e ativação plaquetária, que leva a uma falência da microcirculação e lesão endotelial (WELBORN et al., 1991; RUSSEL et al, 1989).

O AMP cíclico elevado devido à prostaglandina age diretamente sobre os neutrófilos ao inibir a elevação intracelular de cálcio e ativação da proteína quinase C, provocando a redução de sua agregação, liberação de enzimas lisossomais e ativação da NADPH-oxidase (MITSUYAMA et al, 1993). Há também ação indireta sobre a atividade dos neutrófilos pois a prostaglandina age sobre as células de Kupffer inibindo sua ativação e liberação de mediadores (KARCK et al, 1988) .

As prostaglandinas podem ser consideradas hormônios de ação local, pois agem e são metabolizadas nas células próximas ao local onde são produzidas. Diversos estudos já demonstraram a utilização sistêmica de prostaglandinas na preservação de órgãos (STACHURA et al, 1981; CRAFA et al,1991; LAMBOTTE et al, 1988; SIKUJARA e MONDEN, 1983; STEININGER et al,1988; OLTHOFF e WASEF, 1991; BESSE et al,1989; OKABE et al., 1986; TOTSUKA et al,1999; NILSSON et al., 2001; CURTIS et al.,1993; SUYLICHEM et al, 1997;). Porém existem poucos estudos utilizando-se da droga diretamente em soluções de perfusão (HELLING et al.,1995; MIZOGUCHI et al., 1987). Utilizou-se a dosagem de 25 mcg/kg de análogo de prostaglandina E1 para perfusão do grupo teste devido ao fato de que, a partir desse valor não se observa diminuição significativa das lesões teciduais nos órgãos perfundidos com o aumento da dosagem do análogo de prostaglandina E1 (HELLING et al., 1995; TOTSUKA et al., 1999) .

Observou-se redução significativa de necrose celular, infiltrado inflamatório e lesão endotelial após perfusão com prostaglandina. Pode-se considerar isso como resultado da ação da prostaglandina sobre receptores celulares com conseqüente diminuição de lesão hepatocítica pela anóxia ; inibição de agregação plaquetária e vasodilatação, com redução da lesão endotelial e inibição de agregação e ativação de neutrófilos, que também contribui para uma redução da lesão tecidual.



## ***6. CONCLUSÃO***

Conclui-se que a utilização de análogo de prostaglandina E 1, misoprostol, em solução de perfusão reduz lesão hepatocítica e endotelial e diminui infiltrado inflamatório no tecido hepático. Desse modo, é provável que confira proteção ao tecido hepático quando este é submetido a um período de isquemia fria mais prolongado.



## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ARAI, M; PENG, X.; CURRIN, R.T.; THURMAN, R.G.; LEMASTERS, J.J. Protection of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury by prostaglandin E2 derived from Kupffer cells. **Transplantation** **68(3)**: 440-5, 1999.

ATMACA, M.; FRY, J.R. Inhibition of glutathione synthesis by adenosine: possible implications for development of liver preservation fluids. **Transplantation** **65(4)**: 1139, 1998.

BELZER, F.O .; ASHBY, B.S.; DUNPHY, J.E. 24-72 hour preservation of canine kidneys. **Lancet** **2**: 536-41, 1967.

BESSE, T. ; GUSTIN, T.; CLAEYS, P. Effect of PGI2 and thromboxane antagonists on liver ischemic injury. **Eur. Surg. Res.** **21**: 213-7, 1989.

BROIN, E.; URATA, K.; GIROUX, L.; LEPAGE, R.; HUET, P.M. Effect of calcium antagonists on rat liver during extended cold preservation-reperfusion. **Transplantation** **63**: 1547-54, 1997.

BROKELMAN, W.; STEL, A .L.; PLOEG, R.J. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation in the University of Wisconsin solution era. **Transp. Proc.** **31**: 2087-90, 1999.

CARTAYA, R.C.; PIFANO, E.; VEGAS, A .; MEIJOMIL, P.; SORIO, L. Isquemia y perfusion hepática em ratas: efecto de la nimodipina y la clorpromazina. **Rev.Ven. Cir.** **44**: 61-66, 1991.

CARUY, C. A .A . Efeitos hepáticos da associação de anestésicos voláteis e paracetamol; estudo experimental em ratos. **Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas**, 1998.

CHAPCHAP, P. Efeito das soluções de preservação sobre a ultra estrutura do enxerto hepático: estudo experimental. São Paulo, 1992. Tese de Doutorado. Fac. Med. USP.

COLLETTI, L.M.; REMICK, D.G.; BURTCHE, G.D. Role of a tumor necrosis factor in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. **J. Clin. Invest.** **85**: 1936-43, 1990.

COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P.I. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hour ice storage. **Lancet** **2**: 1219-24, 1969.

CRAFA, F.; GUGENHEIM, J.; SAINT-PAUL, M.C. Protective effects of prostaglandin E1 on normothermic liver ischemia. **Eur. J. Res.**, **23**: 278-84, 1991.

CURTIS, L.D.; ANWAR, N.; BRIGGS, J.D.; BUCKELS, J.A. .C.; JONES, M.; KARIM, M.S.; KOFFMAN, G.; MCGREGOR, E.; NEILD, G.; RIAD, H.N. Misoprostol in renal transplantation. **Transp. Proc.** **25**: 602-3, 1993.

D'ALESSANDRO, A .M.; SOUTHWARD, J.H.; LOVE, R.B.; BELZER, F.O . Organ preservation. **Surg. Clin. N. Am.** **74 (5)**: 1083-95, 1994.

DOUSSET, B.; FILIPPONI, F.; SOUBRANE, O .; BOILLOT, O .; HOUSSIN, D.; CHAPUIS, Y. Partial hepatic resection for ischemic graft damage after liver transplantation: a graft saving opinion? **Surgery** **115 (5)** : 540-5, 1994.

FAVERO, S.S.G. Estudo comparativo das alterações ultra estruturais do endotélio sinusoidal na isquemia e reperfusão do fígado com normotermia e hipotermia. Tese de Mestrado. São Paulo, 1996. Fac. Med. Santa Casa.

FRIEDMAN, N.K.; CARAFOLI, E.; BIBER, J.; MURER, H. ATP dependent Ca uptake in isolated hepatic plasma membrane vesicles. **Ann N. Y. Acad. Sci.** **402**: 440-2, 1982.

GEIGER, J. ; NOLTE, C.; WALTER, U. Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium derived factors. **Am. J. Physiol.** **267**: C236-C244, 1994.

HARVEY, P.R.C.; IU, S.; MCKEOWN, C.M.B. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. **Transplantation** **45**: 1016-20, 1988.



HELLING, T.S.; WOGAHN, B.M.; OLSON, S.A. The effect of prostaglandin E1 on liver adenine nucleotides and cytoplasmic enzymes in porcine model of normothermic hepatic ischemia. **Hepatology** 22: 1554-9, 1995.

IASI, M. Transplante hepático: preservação com solução Santa Casa- SP. Especial referência ao estresse oxidativo tecidual. Tese de Doutorado. Fac. Ciências Med. Santa Casa. São Paulo, 1999.

IASI, M.; UVO, R.A .B.; FAVERO, S.S.G.; SZUTAN, L.A .; ASSEF, J.C.; ARAÚJO, M.F.; PERCÁRIO, S.; FELIPPE JR., J.; DE CAPUA JR, A .; MASTROTI, R.A . Transplante hepático: avaliação do estresse oxidativo e das alterações histopatológicas na detecção de lesão celular em preservação de 24 horas ( estudo experimental em cães). **J. Biomolec. Mec. Free Rad. 2** : 55-59, 1996.

KALAYOGLU, M.; SOLLINGER, H.W.; STRATTA, R.J. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. **Lancet** 1: 617-23, 1988.

KARCK, U.; PETERS, T.; DECKER, K. The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cells is regulated by prostaglandin E2 and dexamethasone. **J. Hepatol.** 7: 352-61, 1988.

KERRIGAN, C.; STOTLAND, M. Ischemia – reperfusion injury: a review. **Microsurgery** 14: 166-7, 1993.

KIM, J.S.; SOUTHARD, J.H. Effect of liver preservation on hepatocyte calcium and ATP regeneration. **Transp. Proc.** 29: 3447-8, 1997.

KLEIN, M.; GEOGHEGAN, J. WANGMANN, R.; BÖCLER, D.; SCHIMDT, K.; SCHEELE, J. Preconditioning of donor livers with prostaglandin I2 before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury . **Transplantation** 67 (8): 1128-32, 1999.

KOEPPEL, T.A .; TRAUNER, M.; MENNONE, A .; ARRESE, M.; RIOS-VELEZ, L.; BOYER, J.L. Role of glutathione in hepatic bile formation during reperfusion after cold ischemia of the rat liver. **J. Hepatol.** 28 (5): 812-9, 1998.

KUROKAWA, T.; TAKAGI, H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. **Transp. Proc.** **31**: 1775-6, 1999.

LAMBOTTE, L.; HAMPTINNE, B.; ALVAREZ-LOPEZ, A. ; BESSE, T. Effects of calcium blocking agents and prostaglandin I<sub>2</sub> or E<sub>2</sub> on the tolerance of the rat liver to ischemia. **Transp. Proc.** **20**: 986, 1988.

LEVINE, R.A. The role of cyclic AMP in hepatic and gastrointestinal function. **Gastroenterology**, **59**: 280-300, 1970.

MARUBAYASHI, S. ; TAKENAKA, M.; DOHI, K. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. **Transplantation** **30**: 294-6, 1980.

McCORD, J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. **N. Eng. J. Med.** **17**:159-63, 1985.

MIES, S.; FERNANDES, L.; CASTRO E SILVA JR., O. ; RAIA, S. Transplante ortotópico de fígado em ratos. **Acta Cir. Brás.** **6**: 116-122, 1991.

MINAMI, K.; FUKUZAWA, K. NAKAYA, Y. Mechanism of activation of the Ca activated K channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. **Life Sci** **53**: 1129-35, 1993.

MITSUYAMA, T.; TAKESHIGE, K. ; MINAKAMI, S. Cyclic AMP inhibits the respiratory burst of electropermeabilized human neutrophils at a downstream site of protein kinase C. **Biochem. Biophys. Acta** **1177**: 167-73, 1993.

MIZOGUCHI, Y.; YSUTSUI, H.; MIYAJIMA, K. The protective effects of prostaglandin E<sub>1</sub> in an experimental massive hepatic cell necrosis model. **Hepatology** **7**: 1184-8, 1987.

NAKANO, H.; MONDEM, M. Cytoprotective effect of prostaglandin I<sub>2</sub> analogue on superoxide-induced hepatocyte injury. **Surgery** **116**: 883-9, 1994.

- NICOTERA, P.; HARTZELL, P.; BALDI, C. Cystamine induced toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. **J. Biol. Chem.** ,261: 14628-14635, 1986.
- NILSSON, B.; DELBRO, D.; WALLIN, M.; FRIMAN, S. Protective effect of nitric oxide and prostaglandin E2 in ischemia/reperfusion injury of the liver. **Transp. Proc.** 33: 2518-20, 2001.
- OKABE, K.; MALCHESKY, P.S.; NOSE, Y. Protective effect of prostaglandin I2 on hepatic mitochondrial function of the preserved rat liver. **Tohoku J. Exp. Med.** 150: 373-379, 1986.
- OLTHOFF, K.M.; WASEF, E. PGE1 reduces injury in hepatic allografts following preservation. **J.Surg. Res.** 50: 595-601, 1991.
- PALOMBO, J.D.; BLACKBURN, G.L.; FORSE, R.A. Endothelial cells factors and response to injury. **Surg, Gynecol. Obstet.** 173: 505-18, 1991.
- PEGG, D.E. Organ Preservation. **Surg. Clin. N. Am** 66: 617-32, 1986.
- PETERS, S.P.; KAGEY-SOBOTKA, A. ; MacGLASHAN, D.W.; LICHTENSTEIN, L.M. Effect of prostaglandin D2 in modulating histamine release from human basophils. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 228: 400-406, 1984.
- PLOEG, R.J.; D'ALESSANDRO, A .M.; KNECHTLE, S.J.; VAN BOCKEL, J.H. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation. A multivariate analysis. **Trasnplantation** 55: 807-12, 1993.
- PLOEG, R.J.; VAN BOCKEL, J.H.; LANGENDJIK, P.T. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. **Lancet** 340: 129-133, 1992.
- RENTSCH, M.; POST, S.; PALMA, P.; GONZALEZ, A .P.; MENGER, M.D.; MESSMER, K. Intravital studies on beneficial effects of warm Ringer's lactate rinse in liver transplantation. **Transp. Int.** 9 (5) : 461-7, 1996.

ROBINSON, B.F.; COLLIER, J.G.; KARIM, S.M.M.; SOMERS, K. Effect of prostaglandins A1, A2, B1, E2 and F2 on forearm arterial bed and superficial hand veins in man. **Clin. Sci.** **44**: 367-76, 1973.

RUSSELL, R.C.; ROTH, A .C.; KUCAN, J.O .; ZOOK, E.G. Reperfusion injury and oxygen fire radicals: a review. **J. Reconst. Microsurg.** **5**: 79-84, 1989.

SCHILLING, M.; TIAN, Y.H.; BÜCHLER, M.W. Effect of temperature on hepatic and renal uptake of components from university Wisconsin solution. **Transplantation** **65 (7)**: 989-92, 1998.

SIKUJARA, O .; MONDEN, M. Cytoprotective effect of prostaglandin I2 on ischemia induced hepatic cell injury. **Transplantation** **36**: 238-43, 1983.

SOULTHARD, J.H.; BELZER, F.O . Principles of organ preservation. **Surg. Rounds** **5**: 353-9, 1993.

SOULTHARD, J.H.; BELZER, F.O .The University of Wisconsin organ preservation solution: components, comparisons and modifications. **Transp. Rev.** **7**: 176-82, 1993.

STACHURA, J.; TARNAWSKI, A .; IVEY, K.J. Prostaglandin protection of carbon tetrachloride induced liver cells necrosis in the rats. **Gastroenterology** **81**: 211-7, 1981.

STEININGER, R.; MUHLBACHER, F.; RAUHS, R. Protective effect of PGI2 and diltiazem on liver ischemia and reperfusion in pigs. **Tranplantation Proc.** **20**: 999-1002, 1988.

SUYLICHEM, P.T.R.; VOS, A .W.F.; GROOETHIUS, G.M.M.; VOS, T.A .; MOSHAGE, H.; PLOEG, R.J. Liver preservation and nitric oxide: no nonsense? **Tansp. Proc.** **29**: 408-9, 1997.

SWEAT, F.W.; WINCEK, T.J. The stimulation of hepatic adenylate cyclase by prostaglandin E1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **55**: 522-9, 1973.

TODO, S.; NERY, J. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. **JAMA** **261**: 711-4, 1989.

TOTSUKA, E.; TODO, S.; ZHU, Y.; ISHIZAKI, N.; KAWASHIMA, Y.; JIN, M.B.; URAKAMI, A. ; SHIMAMURA, T.; STARLZ, T.E. Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol and prostaglandin I2 analogue, OP-41483. **J. Am. Coll. Surg.** **187**: 276-86, 1999.

WELBOURN, C.R.B.; GOLDMAN, G.; PATERSON, I.S. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. **Br.J.Surg.** **78**: 651-5, 1991.

WERF, W.J.; D'ALESSANDRO, A .M. ; HOFFMAN, R.M.; KNECHTLE, S.J. Procurement , preservation and transport of cadaver kidneys. **Renal transplantation** **78**: 41-53, 1998.

WISE, H.; JONES, R.L. Characterization of prostanoid receptors on rat neutrophils. **Br. J. Pharmacol.** , **113**: 581-7, 1994.

YASUI, H. ; YOSHIMURA, N.; KOBAYASHI, Y.; OCHIAI, S.; MATSUDA, T. TAKAMATSU, T.; OKA, T. Microstrutural changes of bile canaliculi in canine liver: the effect of cold ischemia reperfusion in orthotopic liver transplantation. **Transp. Proc.** **30**: 3754-7, 1998.

YUN, J.C.H.; OHMAN, K.P.; GILL JR, J.R.; KEISER, H. Effects of prostaglandins, cyclic AMP and changes in cytosolic calcium on platelet aggregation induced by a thromboxane A2 mimic. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **69**: 599-604, 1991.



## **8. *ANEXOS***

**TABELA 1**

**Lesões teciduais observadas em cada animal do grupo controle com 18 horas de isquemia fria.**

<b>Animal</b>	<b>Edema intersticial</b>	<b>Degeneração gordurosa</b>	<b>Degeneração hidrópica</b>	<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>Necrose celular</b>	<b>Lesão epitélio biliar</b>	<b>Lesão endotélio</b>
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	1	0	2
4	0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	0	0	1	2
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	1	0	0	0	0	1	1
12	1	1	0	1	1	1	2
13	0	0	0	1	1	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

**TABELA 2**

**Lesões teciduais observadas em cada animal do grupo teste com 18 horas de isquemia fria.**

<b>Animal</b>	<b>Edema intersticial</b>	<b>Degeneração gordurosa</b>	<b>Degeneração hidrópica</b>	<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>Necrose celular</b>	<b>Lesão epitélio biliar</b>	<b>Lesão endotélio</b>
1	0	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	0	1	0	0
3	0	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	1	0
6	1	0	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	1	1	1	0	0	0	1
13	1	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	1	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0



**TABELA 3**

**Lesões teciduais observadas em cada animal do grupo controle com 24 horas de isquemia fria.**

<b>Animal</b>	<b>Edema intersticial</b>	<b>Degeneração gordurosa</b>	<b>Degeneração hidrópica</b>	<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>Necrose celular</b>	<b>Lesão epitélio biliar</b>	<b>Lesão endotélio</b>
1	0	0	0	1	1	0	0
2	0	0	0	0	1	0	0
3	0	0	0	2	2	0	3
4	1	1	0	1	0	0	1
5	1	2	1	1	1	2	2
6	0	0	0	1	1	1	1
7	0	0	0	1	1	0	1
8	0	0	0	1	1	0	0
9	0	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	1	1	0	1
11	1	0	0	1	1	1	2
12	1	2	1	3	2	1	3
13	0	0	0	2	3	1	2
14	0	0	0	2	1	1	1
15	0	0	0	1	1	0	1

**TABELA 4**

Lesões teciduais observadas em cada animal do grupo teste com 24 horas de isquemia fria.

Animal	Edema intersticial	Degeneração gordurosa	Degeneração hidrópica	Infiltrado inflamatório	Necrose celular	Lesão epitélio biliar	Lesão endotélio
1	0	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	0	1	0	0
3	0	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	1	1
6	1	0	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	1	1	1	0	0	0	1
13	1	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	1	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0